

Эффективность использования солевого раствора при искусственном осеменении икры радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Waibaum, 1972) и ладожской палии *Salvelinus alpinus lepechini* (Gmelin, 1788)

DOI

Кандидат биологических наук
Н.И. Шиндавина – ведущий научный сотрудник лаборатории селекции рыб

А.Г. Мосеев – начальник
рыбоводного участка

Кандидат биологических наук
В.Я. Никандров – ведущий научный сотрудник лаборатории селекции рыб

Федеральный селекционно-генетический центр рыбоводства (ФСГЦР филиал ФГБУ «Главрыбвод»), пос. Ропша, Ленинградская область

@ fsgzr.lo@yandex.ru

Ключевые слова:

радужная форель, палия, солевой раствор, подвижность спермиев, полостная жидкость, уровень оплодотворения

Keywords:

rainbow trout, palia, saline solution, sperm motility, ovarian fluid, fertilization rate

EFFICIENCY OF USE OF SALINE SOLUTION AT THE ARTIFICIAL INSEMINATION OF EGGS OF RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS* (WAIBAUM, 1972) AND LADOGA LAKE PALIA *SALVELINUS ALPINUS LEPECHINI* (GMELIN, 1788)

Candidate of Biological Sciences **N.I. Shindavina** – Leading researcher of the Fish Breeding Laboratory;

A.G. Moseev – Head of the Fish Breeding site;

Candidate of Biological Sciences **V.Ya. Nikandrov** – leading researcher of the Fish Breeding Laboratory

Federal Breeding and Genetic Center of Fish Farming (FSGCR branch of FSBI "Glavrybvod"), village Ropsha, Leningrad region

In order to increase the level of fertilization of eggs, the effect of buffer solution on sperm activity and the effectiveness of its use as a medium for insemination eggs of rainbow trout which was grown in conditions of flowing water and in recirculation aquaculture system (RAS), as well as Ladoga palia, were tested. In male trout and palia, the number of motile spermatozoa and their activity were higher in solution than in water. In trout which was grown in running water, the percentage of eggs fertilization increased significantly when use solution only in cases when the eggs were contaminated with the contents of burst eggs. In fish grown in the RAS, the replacement of water with a buffer solution increased the level of fertilization in all test variants, regardless of the presence or absence of contamination of the eggs. In Ladoga palia, the result of insemination was the same in water and in solution.

ВВЕДЕНИЕ

В природных популяциях уровень оплодотворения икры определяется, главным образом, качеством половых продуктов самок и самцов, участвующих в нересте. При заводском разведении рыб этот показатель зависит от взаимодействия трех факторов: готовности яйцеклеток к оплодотворе-

нию, оплодотворяющей способности сперматозоидов и биотехники осеменения.

Во время ручного отцеживания самок возможно попадание в икру различных примесей в виде крови, мочи и фекалий. Эти виды загрязнений, как выяснилось, не оказывали заметного влияния на результат осе-

менения икры, если только загрязнение не было слишком сильным [1]. К самым опасным примесям относят содержимое икринок, разрушающихся во время отцеживания или перемешивания больших объемов икры. Исследования показали, что даже незначительное количество содержимого яйцеклеток препятствовало нормальному оплодотворению, а при разрушении более 1% икринок оплодотворяемость могла снизиться до нулевого уровня [2]. Для устранения негативного влияния загрязнения используют специально разработанные солевые растворы. Их эффективность была убедительно показана в исследованиях, проведенных на радужной форели [2; 3; 1; 4].

В селекционно-генетическом центре рыбоводства (Ленинградская обл.) с 2008 г., наряду с традиционными методами выращивания рыб в проточной воде, используют УЗВ – установку замкнутого водоснабжения [5]. Для повышения экономической эффективности рыбоводства выращивают однополое женское потомство, используя самцов-реверсантов.

В 1999 г. были начаты работы по заводскому воспроизводству ладожской палии. Потомков заводских производителей ежегодно выпускают в Ладожское озеро. Одновременно разрабатывается технология товарного разведения палии.

Цель нашей работы состояла в решении двух задач: во-первых, в оценке влияния буферного раствора на подвижность сперматозоидов генетических и реверсивных самцов радужной форели, выращенной в условиях проточной прудовой воды и УЗВ, а также самцов заводского стада ладожской палии; вторая задача заключалась в проверке эффективности использования буферного раствора в качестве среды для осеменения икры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

Работу проводили в Федеральном селекционно-генетическом центре рыбоводства (пос. Ропша, Ленинградская обл.) в 2014-2015 гг. и в 2018-2019 годы.

Объектами исследования послужили:

- самки и самцы радужной форели породы Рофор [6] трехгодичного возраста, которых содержали в бетонированных прудах с проточной речной водой в условиях естественного освещения. Среднемесячная температура воды менялась в пределах 7-17°C в весенне-летний период и 3-7°C – в осенне-зимний сезон.

- четырехгодовалые самки и трехгодовалые самцы-реверсанты радужной форели, селекционируемой на создание породы для разведения в УЗВ [5]. Весь цикл выращивания рыб проходил в закрытом помещении при искусственном освещении. Температура воды не имела сезонных колебаний и поддерживалась на постоянном уровне: 10±1°C.

- пятигодовалые самки и четырехгодовалые самцы ладожской палии III поколения заводского разведения [7; 8]. Производителей выращивали в закрытом помещении в проточных бассейнах с ключевым водоснабжением. Температура воды в зимние месяцы менялась в пределах от 4,5 до 8°C, в весенне-летние – от 6 до 14°C.

В целях повышения уровня оплодотворения икры проверили влияние буферного раствора на активность сперматозоидов и эффективность его использования в качестве среды для осеменения икры радужной форели, выращенной в условиях проточного и замкнутого водоснабжения, а также – ладожской палии. У самцов форели и палии количество подвижных сперматозоидов и их активность были выше в растворе, чем в воде. У форели, содержащейся на проточной воде, процент оплодотворения икры при осеменении в растворе значительно повышался лишь в тех случаях, когда икра была загрязнена содержимым лопнувших яйцеклеток. У рыб, выращенных в УЗВ, замена воды буферным раствором повышала уровень оплодотворения во всех вариантах проверки, независимо от наличия или отсутствия загрязнения икры. У ладожской палии результат осеменения был одинаковым в воде и в растворе.

На первом этапе работ проводили индивидуальную оценку самцов по активности сперматозоидов в воде и буферном растворе. В качестве испытуемого раствора использовали солевой раствор, наиболее часто применяемый в зарубежном форелеводстве и известный под названием D532 [9]. В его состав входят: 24,2 г Трис + 22,5 г глицин + 1,1 г CaCl₂ + 73,1 г NaCl на 10 л дистиллированной H₂O (рН=9,0). Контролем служила вода, поступающая в инкубационный цех. Раствор готовили в день его апробации, затем выравнивали температуру раствора с температурой воды.

Сперму отдельно взятых самцов оценивали по двум показателям: продолжительности поступательного движения (с), и количестве активных спермиев (%). Активность измеряли с помощью секундомера, процент подвижных спермиев определяли визуально в поле зрения микроскопа. Для оценки были взяты случайные выборки из 24 экз. самцов форели Рофор, 50 самцов-реверсантов и 18 самцов палии.

На втором этапе работ у каждой испытуемой самки перед осеменением икры проводили тестирование полостной жидкости на наличие в икре содержимого лопнувших яйцеклеток. Для этого в небольшую порцию полостной жидкости, собранной в процессе ручного отцеживания, добавляли такое же количество воды. В случае загрязнения икры в прозрачной среде тотчас появлялась белесоватая мутьность [4; 10].

Заключительным этапом работ являлась проверка эффективности использования буферного раствора в качестве среды для осеменения икры.

При испытании раствора у форели Рофор и ладожской палии были индивидуально оценены по 11-ти самок случайной выборки. От каждой самки брали по две небольшие порции икринок (300-400 шт.), одну из которых осеменяли в воде, вторую – в растворе. Икру, полученную от всех самок, осеменяли одной смесью спермы. Каждую порцию икры инкубировали отдельно.

У форели, выращенной в УЗВ, эксперименты проводили в условиях производственной инкубации. У каждой из 20 испытуемых самок икру делили по весу на две равные порции, одну из которых осеменяли с водой, другую – с буферным раствором. В каждом варианте обе порции икры осеменяли одной и той же свежеприготовленной смесью спермы от 8-10 самок.

Температура воды при инкубации икры форели Рофор была постоянной: $6 \pm 0,3^\circ\text{C}$. В цехе УЗВ икра форели развивалась при температуре воды $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для оценки результатов осеменения икры использовали показатель процента оплодотворения, который определяли на 10 сутки инкубации при 6°C и на 7 сутки – при 10°C , в период обрастания желтка бластодермой зародыша. Пробу из 50-70-ти икринок помещали в спиртово-уксусную смесь (3:1) для просветления оболочки и визуально определяли количество развивающихся зародышей, которое соотносили с общим количеством икринок в пробе (%).

Всего было исследовано 92 экз. самцов, 40 самок и 75,4 тыс. шт. икры.

Статистический анализ данных проводили по стандартным методикам [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Характеристика подвижности сперматозоидов. Оценка самцов форели Рофор показала, что у 96% рыб сперма была подвижной, как в воде, так и в растворе. Оба критерия оценки подвижности сперматозоидов, характеризовались более высокими показателями в растворе по сравнению с водой (табл. 1). При этом различия между вариантами по

продолжительности активного состояния спермиев были достоверными ($p=0,05$).

Согласно исходным данным, у большинства самцов (65%) сперматозоиды двигались дольше в растворе, у 22% – дольше в воде, а у 13% самцов в воде и в растворе подвижность была одинаковой. В одном случае все спермии были неподвижны в воде, а в растворе проявили активность 35% гамет.

В ходе эксперимента сперму одного из самцов, у которых 100% сперматозоидов были активными в воде и в растворе в течение 23 и 29 секунд, соответственно, оставили на хранение в пробирке. Через 2,5 часа активность гамет в воде была нулевой, в растворе – 30% спермиев были подвижными в течение 13 секунд.

Результаты оценки инвертированных самцов, выращенных в условиях УЗВ, представлены в таблице 2. Продолжительность движения и доля активных спермиев были выше в растворе, по сравнению с водой при уровнях достоверности $p=0,001$ и $p=0,01$, соответственно. Согласно исходным данным, у 22% рыб подвижность гамет в воде была нулевой.

По сравнению с самцами форели Рофор, у инвертированных самцов, были достоверно ниже оба критерия оценки спермы как в воде, так и в растворе ($p=0,001$).

У самцов ладожской палии продолжительность поступательного движения в растворе была достоверно выше ($p=0,01$). Количество подвижных спермиев в растворе было в среднем больше почти на 20%, но это различие не достигало достоверного уровня (табл. 3).

Таблица 1. Подвижность сперматозоидов самцов форели Рофор в воде и солевом растворе / **Table 1.** Spermatozoa motility of Rofor trout males in water and in saline solution

Признак	Вода		Раствор	
	$X \pm m$	lim	$X \pm m$	lim
Активность, с	$25 \pm 1,4$	14-39	$30 \pm 1,8$	17-49
Количество подвижных спермиев, %	$74 \pm 7,9$	0-100	$91 \pm 4,7$	25-100

Примечание: Здесь и далее: $M \pm m$ – среднее значение, его ошибка; lim – пределы варьирования признака

Таблица 2. Подвижность сперматозоидов инвертированных самцов в воде и солевом растворе / **Table 2.** Spermatozoa motility of males in water and in saline solution

Признак	Вода		Раствор	
	$X \pm m$	lim	$X \pm m$	lim
Активность, с	$18 \pm 0,7$	13-23	$24 \pm 0,8$	19-29
Количество подвижных спермиев, %	$38 \pm 5,6$	0-100	$64 \pm 5,5$	0-100

Таблица 3. Подвижность сперматозоидов самцов палии в воде и растворе / **Table 3.** Spermatozoa motility of palia males in water and in saline solution

Признак	Вода		Раствор	
	$X \pm m$	lim	$X \pm m$	lim
Активность, с	$41 \pm 2,1$	29-60	$49 \pm 1,8$	35-64
Количество подвижных спермиев, %	$68 \pm 10,3$	0-100	$87 \pm 6,1$	10-100

Анализ исходных данных показал, что по качеству спермы самцов можно было разделить на две группы. У 60% рыб в обеих средах были активны 100% сперматозоидов. У остальных самцов доля подвижных гамет в воде составляла в среднем $18 \pm 9,7\%$, меняясь в пределах от 0 до 70%, а в растворе возрастала до $67 \pm 12,7\%$, сохраняя большей уровень разнообразия: от 10 до 100%. В этой группе рыб различия между вариантами достигали достоверного уровня ($p=0,05$). При этом, у одного из самцов, при полном отсутствии подвижности спермиев в воде, в растворе наблюдали 30% активных клеток.

Результаты оценки самок по характеристике полостной жидкости. При смешивании полостной жидкости с водой она оставалась прозрачной у 80% самок форели Рофор, у 65% форели, выращенной в УЗВ, и у 100% исследованных самок палии. У остальных особей контакт с водой вызывал помутнение разной степени интенсивности.

Сравнительная оценка результатов осеменения икры в воде и буферном растворе. Различия в качестве полостной жидкости отразились на результатах инкубации икры.

У самок форели Рофор с прозрачной полостной жидкостью процент оплодотворения икры сохранял высокий уровень при осеменении в обеих средах. У самок с мутной жидкостью процент оплодотворения икры в растворе был на 37% выше, чем в воде, что можно видеть из данных, представленных ниже:

Результат тестирования полостной жидкости	Оплодотворяемость икры, %	
	вода	раствор
Прозрачная	93	96
Мутная	59	96

При использовании спермы инвертированных самцов процент оплодотворения икры был крайне низким при осеменении в воде и высоким при использовании раствора, независимо от наличия загрязнения икры, как показано ниже:

Результат тестирования полостной жидкости	Оплодотворяемость икры, %	
	вода	раствор
Прозрачная	49	93
Мутная	39	90

У ладожской палии между показателями процента оплодотворения в разных средах заметных различий не было выявлено:

Результат тестирования полостной жидкости	Оплодотворяемость икры, %	
	вода	раствор
Прозрачная	53	54

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние десятилетия появились новые технологии и методы выращивания и разведения радужной форели. К их числу относятся установки замкнутого водоснабжения. Большим спросом пользуется посадочный материал для выращивания однополых популяций, для получения которого используют метод преобразования самок в реверсивных самцов. Новые методы и технологии, а также селекция рыб, с целью создания маточных стад производителей с высокими потенциями роста и развития, в новых условиях может привести к изменению биологических особенностей рыб и, в частности, качества их половых продуктов.

У самок форели Рофор, выращенных в проточной воде, сперма была лучше по всем показателям, чем у форели, содержащейся в УЗВ. Здесь могли влиять два фактора: условия выращивания и реверсия пола. О влиянии условий разведения может свидетельствовать также результат сравнительной оценки самок: у рыб, выращенных в УЗВ, был значительно ниже уровень оплодотворения икры при осеменении в воде, чем у самок форели Рофор.

У самок форели Рофор буферный раствор значительно повышал процент оплодотворения икры, в случае загрязнения ее лопнувшими икринками, и не влиял на результаты осеменения самок с чистой икрой. Поэтому, можно рекомендовать при отцеживании самок тестировать полостную жидкость и либо отбраковывать икру таких самок, либо при ее осеменении заменять воду раствором. При этом, наряду с буферным раствором D532, эффективны и другие растворы [12].

При выращивании форели в условиях УЗВ, а также при использовании инвертированных самцов применение раствора было обязательным и не зависело от результатов тестирования полостной жидкости.

У всех исследованных самок палии полостная жидкость была прозрачной, что свидетельствовало об отсутствии загрязнения икры. По-видимому, вследствие этого не было выявлено различий в результатах осеменения с использованием разных сред. Результат инкубации икры определялся качеством яйцеклеток и наличием достаточного количества спермы. Таким образом, у палии использование буферного раствора целесообразно в случае недостатка самцов и дефицита спермы хорошего качества с высоким процентом подвижных сперматозоидов.

Ранее у заводской ладожской палии в период созревания были выявлены самки с порционным (неполным) созреванием икры. Отличительной особенностью этих рыб было загрязнение икры содержимым лопнувших икринок и низкий уровень оплодотворения в воде. В этом случае при осеменении икры рекомендовано использовать растворы [13].

Эффективность буферного раствора в значительной степени проявилась при оценке активности спермы. При замене воды раствором достоверно увеличивалась продолжительность поступательного движения гамет ($p=0,01$), а также достоверно возрастала доля активных спермиев

у самцов с низким процентом этого показателя ($p=0,05$).

Повышение интенсификации производства, использование установок замкнутого водоснабжения, специальные температурные режимы и, связанные с этим, высокие концентрации рыб, рецепты кормов и нормы кормления оказывают значительное воздействие на многие стороны жизнедеятельности рыб, в том числе на формирование яйцеклеток в процессе гаметогенеза и тем самым, на качество потомства. Как показали исследования, проведенные нами ранее на радужной форели, частота и степень загрязнения полостной жидкости содержимым лопнувших яйцеклеток может быть значительной и обусловленной разными факторами, такими, например, как качество кормов и опыт обращения с производителями [4]. Проведение подобных исследований целесообразно проводить на племенных хозяйствах, каждое из которых имеет свои специфические особенности условий выращивания, способные оказывать влияние на качественные показатели производителей. Совершенствование методов осеменения икры может значительно повышать эффективность производства, о чем свидетельствуют результаты нашей работы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Вклад в работу авторов: **Н.И. Шиндавина** – обоснование работы, разработка схемы эксперимента, участие в написании статьи; **А.Г. Мосеев** – проведение экспериментальных работ; **В.Я. Никандров** – анализ полученных данных, участие в написании статьи.

The authors declare that there is no conflict of interest.
Contribution to the work of the authors: **N.I. Shindavina** – justification of the work, development of the experimental scheme, participation in the writing of the article; **A.G. Moseev** – conducting experimental work; **V.Ya. Nikandrov** – analysis of the data obtained, participation in the writing of the article.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ / REFERENCES AND SOURCES

1. Van Heerden, E., Van Vuren J.H.J. and Steyn G.J. Development and evaluation of sperm diluents for the artificial insemination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // Aquatic Living Resources – 1993. – V.6. – №1. – Pp. 57–62. DOI:https://doi.10.1051/alr:1993006
2. Billard, R. A new technique of artificial insemination for salmonids using a sperm diluent // Fisheries. – 1977. – V.1. – Pp. 24–25.
3. Линник, А.В. Оплодотворение икры форели в растворе Хамора и результаты инкубации / А.В. Линник // Сб. научных трудов ВНИИПРХ. – 1984. – №43. – С. 50–53.
3. Linnik, A.V. Fertilization of trout eggs in Hamor solution and incubation results / A.V. Linnik // Collection of scientific papers of VNIIPRH. - 1984. – No. 43. – Pp. 50–53.
4. Шиндавина, Н.И. Оценка самок радужной форели по качеству икры: тестирование на наличие в икре содержимого лопнувших икринок / Н.И. Шиндавина, В.Я. Никандров, Е.В. Моисеева, В.А. Янковская // Рыбное хозяйство. – 2013. – №3. – С. 81–85.
4. Shindavina, N.I. Evaluation of rainbow trout females by caviar quality: testing for the presence of the contents of burst eggs in the caviar / N.I. Shindavina, V.Ya. Nikandrov, E.V. Moiseeva, V.A. Yankovskaya // Fisheries. – 2013. – No. 3. – Pp. 81–85.
5. Голод, В.М. Производство посадочного материала в УЗВ как единство селекции и технологии. / В.М. Голод, Е.Г. Терентьева, В.З. Крупкин / В сб. «Рециркулярные технологии в крытых и открытых системах. Руководство». – Сарваш: Изд-во «НАКИ», 2013. – С. 11–22.
5. Golod, V.M. Production of planting material in the UZV as a unity of breeding and technology. / V.M. Golod, E.G. Terentyeva, V.Z. Krupkin / In the collection "Recirculating technologies in indoor and outdoor systems. The manual". – Sarvash: Publishing house "NAKI", 2013. – Pp. 11–22.
6. Бабушкин, Ю.П. Форель радужная Рофор. / Ю.П. Бабушкин, В.М. Голод, В.Я. Никандров, Г.Г. Савостьянова [и другие] // Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. – М.: Изд-во Мин. сельск. х-ва РФ, 2013. – Т. 2. – С. 24
6. Babushkin, Yu.P. Rainbow trout Rofor. / Yu.P. Babushkin, V.M. Golod, V.Ya. Nikandrov, G.G. Savostyanova [and others] // The State register of breeding achievements approved for use. – M.: Publishing house of the Ministry of Agriculture, 2013. – Vol. 2. – p. 24
7. Никандров, В.Я. Арктический голец (*Salvelinus alpinus* L.) — перспективный объект для аквакультуры севера России / В.Я. Никандров, А.А. Павлисов, Н.И. Шиндавина, А.А. Лукин [и другие] // Арктика: экология и экономика. – 2018. – №3 (31). – С. 137–143. DOI: 10.2583/2223-4594-2018-3-137-143.
7. Nikandrov, V.Ya. Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) — a promising object for aquaculture in the north of Russia / V.Ya. Nikandrov, A.A. Pavlov, N.I. Shindavina, A.A. Lukin [and others] // Arctic: ecology and economics. – 2018. – №3 (31). – Pp. 137–143. DOI: 10.2583/2223-4594-2018-3-137-143.
8. Никандров, В.Я. Научно-методические подходы и опыт разведения арктических голец на примере заводского выращивания ладожской палии *Salvelinus lepechini* (Gmelin 1788) / В.Я. Никандров, Н.И. Шиндавина, В.М. Голод, А.А. Лукин // Рыбное хозяйство. – 2021. – №6. – С. 104–112. DOI: 10.37663/0131-6184-2021-6-104-112.
8. Nikandrov, V.Ya. Scientific and methodological approaches and experience of breeding Arctic char on the example of factory cultivation of Ladoga palia *Salvelinus lepechini* (Gmelin 1788) / V.Ya. Nikandrov, N.I. Shindavina, V.M. Golod, A.A. Lukin // Fisheries. – 2021. – No. 6. – Pp. 104–112. DOI: 10.37663/0131-6184-2021-6-104-112.
9. Billard, R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes // Aquaculture. – 1992. – V.100. – P.263–298. DOI:org/10.1016/0044-8486(92)90385-x
10. Wojtczak M., Kowalski R., Dobosz S., Goryczko K., Kuźmiński H., Glogowski J., Ciereszko A. 2004. Assessment of water turbidity for evaluation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality // Aquaculture. V. 242. P. 617–624.
11. Лакин, Г.Ф. Биометрия. / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. Школа, 1980 – 293 с.
11. Lakin, G.F. Biometrics. / G.F. Lakin. – M.: Higher. School, 1980 – 293 p.
12. Новоженин Н.П. Инструкция по технологии оплодотворения икры форели с использованием оплодотворяющих растворов. / Н.П. Новоженин, А.В. Линник, Г.А. Сычев – М., 1983. – 10 с.
12. Novozhenin N.P. Instructions on the technology of fertilization of trout eggs using fertilizing solutions. / N.P. Novozhenin, A.V. Linnik, G.A. Sychev – M., 1983. – 10 p.
13. Шиндавина, Н.И. Оценка качества икры ладожской палии *Salvelinus alpinus lepechini* с порционным созреванием. Методический аспект / Н.И. Шиндавина, В.Я. Никандров, А.Г. Мосеев // Рыбное хозяйство. – 2019. – №5. – С. 93–95.
13. Shindavina, N.I. Evaluation of the quality of caviar of Ladoga palia *Salvelinus alpinus lepechini* with portion maturation. Methodological aspect / N.I. Shindavina, V.Ya. Nikandrov, A.G. Moseev // Fisheries. – 2019. – No. 5. – Pp. 93–95.